

# Bcl-2 在视神经损伤的运用效果的相关进展

曾奎, 马林昆, 曹霞

**基金项目:** 国家自然科学基金地区基金(No. 31160206)  
**作者单位:** (650101) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院中心实验室  
**作者简介:** 曾奎, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。  
**通讯作者:** 马林昆, 毕业于东南大学医学院, 硕士, 主任医师, 眼科学教授, 院长, 研究方向: 眼底病. mlk\_ynkm@163.com  
**收稿日期:** 2013-07-16 **修回日期:** 2013-09-09

## Progress in application of Bcl - 2 in repairment of the optic nerve injury

Kui Zeng, Lin-Kun Ma, Xia Cao

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31160206)  
Central Laboratory of the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China  
**Correspondence to:** Lin-Kun Ma. Central Laboratory of the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. mlk\_ynkm@163.com  
**Received:** 2013-07-16 **Accepted:** 2013-09-09

### Abstract

• Bcl-2 is a proto-oncogene isolated from follicular B cells, and it is closely related to cell apoptosis. In recent years, it has been widely used in experiments to repair central nervous injury, especially the optic nerve injury. In some cases, it is found that Bcl-2 can inhibit cell apoptosis, prolong cell life span, but can not promote cell proliferation. In other cases, it can not prevent apoptosis caused by certain genetic mutations and thus cannot protect the optic nerve.

• **KEYWORDS:** optic nerve injury; anti-apoptosis; application

**Citation:** Zeng K, Ma LK, Cao X. Progress in application of Bcl-2 in repairment of the optic nerve injury. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(10):1998-2000

### 摘要

Bcl-2 是从滤泡上 B 细胞内分离出来的一个原癌基因, 与细胞的凋亡密切相关。近年来, 其广泛应用于中枢神经的损伤修复实验中, 尤其表现在眼科领域的视神经损伤的研究中, 可以抑制细胞凋亡, 延长细胞生命期限, 不能促进细胞增殖。然而在其他一些实验中, Bcl-2 的抗凋亡作用却不明显, 对于某些基因突变所致的凋亡无阻止作用, 针对视神经的保护作用不明显。

**关键词:** 视神经损伤; 抗凋亡; 运用

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.14

**引用:** 曾奎, 马林昆, 曹霞. Bcl-2 在视神经损伤的运用效果的相关进展. 国际眼科杂志 2013;13(10):1998-2000

### 0 引言

视神经损伤是由许多眼部疾病所导致的视功能损害原因的一种, 严重时会造成患者视神经的萎缩和视功能的不可逆丧失。临床上导致视神经萎缩的疾病有多种, 如青光眼、视神经挫伤、视神经管骨折、遗传性疾病 Leber 病、代谢性疾病(糖尿病、神经节苷脂病、视神经炎和视神经病变)等<sup>[1]</sup>。由于人类视网膜神经节细胞属于中枢神经元, 不能去分化替代已丢失的细胞, 如何对已发生损伤的视网膜神经节细胞及萎缩的视神经进行有效的逆转治疗, 一直是眼科界面临的难题之一。中枢神经系统损伤后的再生问题一直是医学研究的难点和热点问题, 视神经作为中枢神经系统的一部分, 由于其特殊的生理特性而成为中枢神经系统的代表。故探讨视神经损伤后的再生问题, 不仅对视功能的恢复也对中枢神经系统疾病的治疗和视神经损伤后功能的恢复有着重要意义<sup>[2]</sup>。纵观近年来对视神经损伤后促进再生因素的研究, 可分为三大方面: 药物治疗、手术治疗、基因治疗。药物治疗主要包括: (1) 抗凋亡药物; (2) 维生素类; (3) 前列腺素(prostaglandin, PG); (4) 神经营养因子; (5) 其他 brimonidine 是一种高度选择性的 A<sub>2</sub>-肾上腺素受体拮抗剂。手术治疗主要包括: (1) 外周神经移植; (2) 细胞移植: 1) 干细胞移植; 2) 嗅神经鞘细胞移植; 3) Schwann 细胞移植; 4) 巨噬细胞移植。近年来对视神经损伤后治疗的研究可分为三大方面: 药物与针灸治疗、基因治疗、神经移植与干细胞治疗<sup>[3]</sup>。其中基因疗法方法有很多种, Bcl-2 基因就是其中一种, 主要应用其抗凋亡的作用来保护损伤的视神经, 实验结果发现 Bcl2 能够促进小鼠视神经损伤后的再生, 且再生的神经轴突可以长入中脑的靶组织——外侧膝状体和视上丘<sup>[4]</sup>。但目前随着实验运用的增多, 发现 Bcl-2 的抗凋亡效果参差不齐。本文就原癌基因 Bcl-2 目前在视神经损伤研究上的运用效果作一综述。

### 1 Bcl-2 基因概述

自从 1972 年 Kerr 提出细胞凋亡(apoptosis)的概念至今, 人们对细胞凋亡现象进行了广泛、深入的研究。但是, 凋亡的分子和生化机制迄今尚未彻底明了; 而已形成的初步认识大多源于对 Bcl-2 基因家族的研究。已知, 凋亡进程可分为三个时相: 诱导期, 效应期和降解期。在诱导期, 细胞接受各种信号从而引发各种不同的效应; 进入效应期后, 经过一些决定细胞命运(存活/死亡)的分子调控点, 细胞进入不可逆的程序化死亡, 这些调控分子包括一系列原癌基因和抑制癌基因的产生, 其中 Bcl-2 家族起着决定性的作用; 降解期则产生可见的凋亡现象。

Bcl-2 基因(即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因)是一种原癌基因,它具有抑制凋亡的作用,并用近年来的一些研究已开始揭示这一作用的机制<sup>[5]</sup>。目前已经发现的 Bcl-2 蛋白家族按功能可分为两类,一类是象 Bcl-2 一样具有抑制凋亡作用,如哺乳动物的 Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, 线虫 Ced-9, 牛痘病毒 E1B119kD 等,而另一类具有促进凋亡作用,如 Bax, Bcl-Xs, Bak, Bik/Nbk, Bid 和 Harakiri。Bcl-2 抗凋亡的机制目前认为主要有:(1)拮抗促凋亡基因 bax;(2)抑制促凋亡的蛋白质细胞色素 C 自线粒体释放到胞质;(3)阻止胞质中的细胞色素 C 激活 caspase;(4)有抗氧化及维持胞内钙稳态等作用。bax 基因属于 bcl-2 基因家族,编码的 Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体,对 Bcl-2 产生阻抑作用。研究发现 Bax/Bcl-2 两蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素,因此认为,bax 是极重要的促细胞凋亡基因之一。Bax 的表达更为广泛,它可出现在肝细胞、肾小管上皮细胞、呼吸系上皮细胞和支气管平滑肌、血管平滑肌细胞中。

最初在血液淋巴细胞中发现 Bcl-2 能抑制细胞死亡,随后陆续在其它一些细胞中也发现 Bcl-2 的这种作用。但近年来研究发现,除此之外尚存在 Bcl-2 不敏感的凋亡途径<sup>[6]</sup>。

## 2 原癌基因 Bcl-2 在视神经损伤中的应用方向

Bcl-2 的抗凋亡作用主要表现在几个方面:首先,Bcl-2 能使细胞在去除生长因子后存活时间延长;其次,Bcl-2 蛋白可抑制一些生长因子、p53, c-myc, fas 及一些病毒和化疗药物、热休克蛋白、自由基、 $\gamma$  射线和紫外线等所介导的凋亡;另外,许多实验条件下使某些组织细胞过表达 Bcl-2 而阻止这些组织细胞的死亡。Bcl-2 抗凋亡作用的可能机制有:(1)Bcl-2 蛋白作为一种抗氧化剂调节细胞的氧化还原状态及抑制自由基的产生;(2)Bcl-2 与 Bax 结合成杂二聚体以抑制 Bax 的促凋亡作用;(3)Bcl-2 影响胞内钙离子的重新分布,钙离子可激活内源性核酸内切酶和组织转谷氨酰胺酶;(4)影响蛋白激酶的级联放大以及细胞骨架和其它小分子化合物的改变;(5)位于线粒体内膜 Bcl-2 蛋白调节线粒体功能。

Bcl-2 蛋白定位于线粒体膜、内质网膜和核膜上,具有离子通道和停靠蛋白的双重功能,它在介导细胞凋亡的途径中起关键作用。线粒体在细胞凋亡过程中发挥非常重要的作用,Bcl-2 蛋白在线粒体膜上从三个方面抑制细胞凋亡:(1)Bcl-2 能改变线粒体巯基的氧化还原状态来控制其膜电位从而调控细胞凋亡。在细胞凋亡中,线粒体的巯基可能组成了胞内氧化还原电位的传感器,Bcl-2 可能是通过抑制谷胱甘肽(GSH)的外泄,降低胞内的氧化还原电位,来抑制细胞凋亡的;(2)Bcl-2 能调节线粒体膜对一些凋亡蛋白前体的通透性。Bcl-2 蛋白可能是线粒体 Prr 孔道的组成成分,它在较高 pH 的条件下能形成离子通道,而 Bax 则能在较为广泛的 pH 范围内形成孔道。Bax 能允许一些离子和小分子如细胞色素 c 等穿过线粒体膜,进入胞质,从而引起细胞凋亡,而 Bcl-2 的作用正好相反,它能封闭 Bax 形成孔道的活性,使一些小分子不能自由通透,从而保护细胞凋亡;最新研究认为,胞质存在诱导转录因子,可介导胞质基因表达来调节细胞的生存。(3)Bcl-2 能将凋亡蛋白前体 Apaf-1 等定位至线粒体膜上,使其不能发挥凋亡作用。实验证明,尽管 Bcl-2 与胱冬肽酶之间无亲和力存在,但当二者在细胞中同时表

达时却发现它们之间有相互作用。这种作用可能是间接的,是通过第三者 CED-4 来实现的。Bcl-2 能与线虫中的 CED-4 结合并抑制其功能,而 Apaf-1 具有与胱冬肽酶结合的功能域,能参与细胞色素 c 依赖的胱冬肽酶激活<sup>[7]</sup>。这表明 Apaf-1 就象线虫中 CED-4 一样,一方面能激活胱冬肽酶引起凋亡;另一方面又作为接头蛋白能把 Bcl-2 相关蛋白与胱冬肽酶聚集在一起,并使胱冬肽酶失活,从而保护细胞凋亡。其次,Bcl-2 蛋白在内质网上也发挥着重要作用,通过调控内质网 Can 参与的核内外物质转运及膜通透性转换(PT)来阻止细胞色素 C 从线粒体中释放,达到阻止细胞凋亡的级联反应过程,从而阻断细胞凋亡<sup>[8]</sup>。

目前 Bcl-2 在视神经损伤上主要集中于遗传性视网膜变性疾病、视网膜光损伤以及缺血性视神经损伤等方面的研究。有研究表明正常人眼视网膜节细胞、双极细胞中可见到 Bcl-2 原癌蛋白的表达,Bcl-2 蛋白在葡萄糖膜恶性黑色素瘤及结膜恶性黑色素瘤中均有较高的表达,在视网膜母细胞瘤中也可见有 Bcl-2 弱表达<sup>[9]</sup>。由于细胞凋亡过程可引起许多退行性疾病,而 Bcl-2 的高表达则通过阻止细胞的正常凋亡过程促进肿瘤发生,因此临床上可以通过影响 Bcl-2 的表达来治疗一些 Bcl-2 相关疾病:刺激 Bcl-2 基因的表达以抑制凋亡可用来治疗视网膜变性与凋亡增强有关的各种眼病;在一些 Bcl-2 蛋白起重要作用的肿瘤及非肿瘤细胞增殖性疾病中引入抑制 Bcl-2 表达的基因或利用反义寡核苷酸阻抑 Bcl-2 基因 mRNA 的翻译也可达到治疗这些疾病的目的<sup>[10]</sup>。

## 3 原癌基因 Bcl-2 在视神经损伤上的运用效果

Bcl-2 最常运用在视网膜神经节细胞轴突再生中,其中效果有明显的,也有不明显或者无效的。

**3.1 试探** 有效的有:2006 年杨柳和陈东风探讨视神经损伤后 Bcl-2 高表达小鼠再生的视神经如何能长入脑内正常的靶组织,他们对生后 3d (P3)的 C57Bl/6J 野生小鼠和 Bcl-2 转基因小鼠进行左眼视神经夹闭损伤,立刻摘除对侧眼球,4d 后处死小鼠,做视神经和脑组织切片,评估视神经的再生。视神经损伤后玻璃体内注射一种顺行性标记物——带有荧光的霍乱毒素 B (CTB2F),来标记视网膜神经节细胞轴突,并在视神经切片上用抗生长相关蛋白 43 抗体免疫荧光染色显示再生的神经轴突。结果 C57Bl/6J 小鼠视神经损伤后不能再生,而 Bcl-2 转基因小鼠的视神经活跃地再生了相当长的距离,但再生的视神经轴突不能进入两侧正常的视路,而长入前脑白质。从而得出结论:生后 3d 的 Bcl-2 转基因小鼠一侧视神经损伤,同时摘除对侧眼球,去除正常视路的引导后,视神经轴突仍能再生,并可长入脑内,但再生的视神经轴突失去了视路中的引导,不能长入双侧中脑内的靶组织,而是在前脑形成异位神经分布<sup>[11]</sup>。成功的神经再生必须满足以下 3 点:(1)损伤的神经元能够存活;(2)存活的神经元能够在中枢神经系统内生长出轴突;(3)长出的神经轴突能够被引导到正常的靶组织并恢复突触连接。然而这个实验中 Bcl-2 转基因小鼠的视神经轴突的再生为什么不进入正常的通路,视神经的损伤造成了该侧视路上神经生长抑制分子的产生或是影响了引导分子的产生,所以再生的神经轴突避免了向正常对侧脑内靶细胞的投射,而是选择无损伤的对侧眼的视路,走到同侧中脑内的靶组织。一旦对侧眼球摘除,两侧视路均遭到破坏,抑制因子双侧共存,引导分子双

侧均发生紊乱,这时再生的神经轴突会长入异常部位。视神经轴突生长的引导分子非常复杂,再生的视神经轴突在脑内分布的影响因素尚需进行更深入的研究<sup>[12]</sup>。

**3.2 深入** 2009年杨柳,彭媛等就 Bcl-2 转基因小鼠视神经再生轴突做了相关研究。他们用出生 3d 的 C,57Bl/6J 小鼠和 Bcl-2 转基因小鼠行视神经夹闭损伤手术,建立视神经损伤再生模型,夹闭后立刻向玻璃体腔内注射顺行性神经轴突标记物 CTB-F 标记再生的神经轴突,分别在手术后 4,8,10,13,18 和 24d 处死小鼠,做视神经和脑组织冰冻切片,行组织学染色和 GAP-43 免疫荧光染色,观察视神经轴突的再生。实验结果显示:高表达的 Bcl-2 能够促进小鼠视神经损伤后的再生,并且再生的神经轴突在 4d 后长入脑内的靶组织,存活最长至手术后 10d,10d 后再生的神经轴突从脑内靶组织逐渐回缩,18d 时再生的轴突在视神经内完全消失<sup>[12]</sup>。说明虽然 Bcl-2 能够补充视神经轴突再生的内源因子,但轴突的再生不能维持到成年,长期存活还需要其他因素的存在。这就说明 Bcl-2 在视神经损伤修复中只是起到部分作用,作用机制存在局限性。目前的实验研究发现,Bcl-2 可影响视神经轴突的再生,但必须与其他因素协同作用的,靠 Bcl-2 自己是起不到目的作用的<sup>[4]</sup>。

**3.2.1 反驳** 然而也有实验研究发现 Bcl-2 在视神经上的运用没有明显的作用,以下的就是例子:2001 年 Gunnar<sup>[13]</sup>认为啮齿动物的视神经损伤诱导视网膜神经节细胞(RGC)进行细胞凋亡;他们将小鼠的头骨暴露用汉密尔顿注射器脑表面 2.3mm,注入乙酰标记,3d 后在眼眶打开一个纵切口暴露眼球和其后 2mm 处切断的视神经,再关闭缝合。分别观察 7,14d 后的情况,然后进行视网膜解剖和切片,因为有标记,可以计算存活的视神经节细胞的数量,生存了 14d 的小鼠只有 (10±15)% 通过了实验。要测试是否表达抗凋亡基因 Bcl-2 就需要这些视网膜神经节细胞,他们开始研究视神经切断后 7,14d Bcl-2 的小鼠的病变,发现在突变体和野生型视网膜有一些幸存的视网膜神经节细胞。因此,Bcl-2 基因对于视网膜神经节细胞的抗切断诱导的成年小鼠来说,并不是必要的,也不能正常表达延迟视网膜神经节细胞的变性<sup>[14]</sup>。Bcl-2 的抗凋亡作用的运用是有局限性的,并不能用于所有的实验。

**3.2.2 加深** 2001 年 Claudia 等通过相关的研究发现 Bcl-2 本身的表达不能使新生儿的视神经纤维粉碎的再生。他们运用产后 5d 的新生小鼠做实验,因为这个年龄的中枢神经系统的生长环境比成年的要好,因此,可以提高实验的检测概率。他们将这些野生小鼠和 Bcl-2 转基因的小鼠分组:(1)6 只进行视网膜分析的小鼠,其中野生的 2 只;(2)进行视神经分析的 13 只小鼠:(1)不注射雪旺细胞

的 10 只,其中野生的 6 只;(2)注射雪旺细胞的 3 只,其中野生的 1 只。对小鼠进行单方面视神经损伤(夹持伤),每只小鼠的手术时间只能维持 3±4min,在 30d 后,老鼠被麻醉和左眼注射 20% 神经生物示踪,然后对小鼠进行心脏灌注甲醛后,取视神经和视网膜进行解剖分析,发现过度表达 Bcl-2 的小鼠比野生的小鼠的视网膜神经节细胞存活的比例很高,但是却没有迹象表明神经节细胞有再生的潜力。由此,认为 Bcl-2 本身并没有增加切断后视神经的视网膜神经节细胞再生的能力<sup>[15]</sup>。

因此,原癌基因 Bcl-2 参与了视神经损伤的修复过程,存在抗凋亡作用,但却存在相对的局限性,其本能并不能发挥该功能,必须与其他因子协同作用。如上所诉,Bcl-2 目前在视神经损伤上的作用并不能一味完全肯定,还有待进一步的相关研究。

#### 参考文献

- 1 唐秀武,刘金华,王瑛,等.蛇毒神经生长因子对大鼠视神经夹伤保护的电镜观察.眼科新进展 2006;26(5):328-330
- 2 王云松,徐亮,王津津,等.银杏叶提取物对培养大鼠视网膜神经节细胞的保护作用.眼科研究 2006;24(1):24-26
- 3 韩英,刘楠,陈荣华,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 的表达.中国临床神经科学 2006;14(1):15-19
- 4 齐玲,杨宁江,杨淑艳,等. Bcl-2 家族蛋白和信号传导通路.吉林医药学院学报 2011;32(01):31-33
- 5 邓亮,吴娣,洪一江,等. Bcl-2 家族的研究新进展.安徽农业科学 2012;40(4):1936-1938,2073
- 6 付永锋,樊廷俊. Bcl-2 家族蛋白与细胞凋亡.生物化学与生物物理学报 2002;34(4):389-394
- 7 张予阳,史琳琳,郝冬海,等. Bcl-2 在缺血性神经细胞损伤中的作用及药物的影响.中国药理学通报 2010;26(1):21-24
- 8 李捷萌,陈彦青,刘荣国.线粒体凋亡途径与 Bcl-2 家族蛋白研究进展.医学综述 2008;14(4):489-490
- 9 周桔,罗荣保,汤长发,等. Bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应.中国组织工程研究与临床康复 2007;11(10):1950-1952
- 10 王文文,邓毛程. Bcl-2、Bax 及 Bid 与细胞周期阻滞及凋亡调控的关系.广东轻工职业技术学院学报 2009;829(3):21-24
- 11 董雅洁,高维娟. Bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系.中国老年学杂志 2012;32(21):4828-4830
- 12 杨柳,陈东风. Bcl-2 转基因小鼠视神经损伤后再生轴突生长导向的研究.中华眼科杂志 2006;42(2):100-103
- 13 Gunnar PH. Dietz, ertugrul kilic1, mathias Baehr1 and stefan isenmann. Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy. *Neuroreport* 2001;12(15):3353-3356
- 14 吕瀛娟,赵秀兰,王世忠,等.大鼠外伤性视神经损伤后 P53、Bax 和 Caspase3 蛋白的表达.天津医药 2010;38(11):996-998,1028
- 15 Lodovichi C, Cristo GD. Maria cristina cennil and lamberto maffei. Bcl-2 overexpression per se does not promote regeneration of neonatal crushed optic fibers. *Eur J Neurosci* 2001;13(4):833-838